

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 513 738 A2**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: **92107997.6**

⑮ Int. Cl.⁵: **C12N 5/00, C12N 5/06**

⑯ Anmeldetag: **12.05.92**

⑭ Priorität: **14.05.91 DE 4115722**

Heimgartenstrasse 5

W-8177 Bichl(DE)

Erfinder: **Franze, Reinhard, Dr.**

Am Schwadergraben 11

W-8122 Penzberg(DE)

Erfinder: **Lorenz, Thomas, Dr.**

Grube 10 A

W-8122 Penzberg(DE)

Erfinder: **Szperalski, Berthold, Dr.**

Birkenstrasse 133

W-8122 Penzberg(DE)

⑯ Veröffentlichungstag der Anmeldung:

19.11.92 Patentblatt 92/47

⑭ Benannte Vertragsstaaten:

**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL PT
SE**

⑯ Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**

Sandhofer Strasse 112-132

W-6800 Mannheim-Waldhof(DE)

⑯ Erfinder: **Koch, Stefan, Dr.**

Lagoner Strasse 18

W-8122 Penzberg(DE)

Erfinder: **Behrendt, Ulrich, Dr.**

⑯ Vertreter: **Böhm, Brigitte, Dipl.-Chem., Dr. et al**

Kopernikusstrasse 9, Postfach 86 08 20

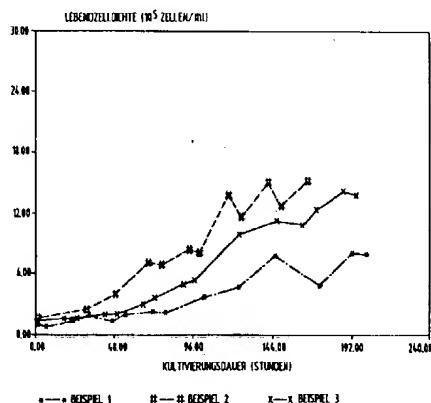
W-8000 München 86(DE)

⑯ Serumfreies Medium zur Kultivierung von Säugerzellen.

⑯ Ein serumfreies Medium zur Kultivierung von Säugerzellen ohne Proteinmaterial tierischen Ursprungs, enthält neben üblichen Inhaltsstoffen anstelle von tierischem Insulin und Transferrin rekombinantes Insulin aus Prokaryonten und eine wasserlösliche Eisenverbindung. Ein derartiges Medium wird erfindungsgemäß zur Kultivierung von Säugerzellen, insbesondere CHO-Zellen verwendet.

Fig.1

SERUMFREIE KULTIVIERUNG VON CHO-ZELEN IM IN-FERMENTER:
LEBENZELLDICHTE



EP 0 513 738 A2

Die Erfindung betrifft ein serumfreies Medium zur Kultivierung von Sägerzellen ohne Proteinmaterial tierischen Ursprungs, sowie ein Verfahren zur Kultivierung von Sägerzellen, insbesondere CHO-Zellen, unter Verwendung eines derartigen Mediums und schließlich ein Verfahren zur gentechnologischen Herstellung von Erythropoietin, bei dem entsprechend transformierte CHO-Zellen in dem erfindungsgemäßen Kulturmedium wachsen.

Für das Wachstum tierischer Zellen in Kultur ist als Mediumzusatz im allgemeinen Serum, meist fötales Kälberserum, Voraussetzung. Dabei wird zu einem bestimmten Grundkomponenten, wie z.B. anorganische Salze, Aminosäuren, Monosaccharide, Vitamine etc., enthaltenden Grundmedium ein Zusatz einer bestimmten Menge von Serum beigemischt, wodurch den Zellen möglichst günstige Bedingungen für das Wachstum in der Zellkultur geboten werden.

Nun wurde bereits versucht, das Serum durch Ersatzstoffe in bekannten serumfreien Medien auszutauschen. So ist z.B. aus der DE-OS 37 33 453 ein serumfreies Medium zur Kultivierung von Hybridom- und Myelomzellen bekannt, das in einem synthetischen Kultivierungsmedium neben anderen, bekannten Zusatzstoffen eine wasserlösliche Eisenverbindung enthält. In der Beschreibung wird hierzu ausgeführt, daß diese wasserlösliche Eisenverbindung ein Ersatzstoff für das im Serum enthaltene Transferrin darstellt. Für die Kultivierung von Hybridom- und Myelomzellen sind gemäß dieser Offenlegungsschrift die dort genannten Medien verwendbar.

In Serum sind jedoch weitere Stoffe enthalten, die das Wachstum von Sägerzellen beeinflussen können. Neben dem Transferrin sind hier insbesondere noch Insulin und Albumin zu nennen. Für die Kultivierung von Sägerzellen ganz allgemein sollte daher bei Verwendung eines serumfreien Mediums möglichst darauf geachtet werden, den Bedingungen, wie sie unter Zugabe von Serum vorliegen, möglichst nahe zu kommen. Für die Herstellung von Therapeutika sind jedoch die Einsatzstoffe kritisch. Hierbei werfen die Zulassungsbehörden bei Zellkulturprodukten unter anderem besonderes Augenmerk auf Proteine als Mediumzusatzstoffe, die tierischen oder humanen Ursprungs sind, weil über diese Komponenten z.B. auch pathogene Viren in die Zellkulturmedien und eventuell ins Endprodukt gelangen können.

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein serumfreies Kultivierungsmedium für Sägerzellen ganz allgemeiner Art zu schaffen, das die Kultivierungsbedingungen unter Verwendung eines Mediums mit Serum sehr nahekommt, jedoch kein Proteinmaterial tierischen Ursprungs enthält, was eine Gefahr von viraler Kontamination darstellen könnte.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein serumfreies Medium zur Kultivierung von Sägerzellen ohne Proteinmaterial tierischen Ursprungs, enthaltend neben üblichen Inhaltsstoffen anstelle von tierischem Insulin und Transferrin rekombinantes Insulin aus Prokaryonten und eine wasserlösliche Eisenverbindung.

Durch die Beibehaltung des Insulin im erfindungsgemäßen Medium sind die Kulturbedingungen deutlich ähnlicher zu Kultivierungsbedingungen unter Verwendung von Serum als dies bei bekannten serumfreien Kultivierungsmedien der Fall ist. Durch Einsatz von rekombinantem Insulin aus Prokaryonten im erfindungsgemäßen Medium wird außerdem die Gefahr viraler Kontaminationen vermieden.

Übliche Inhaltsstoffe von Kultivierungsmedien sind dem Fachmann bekannt und sind beispielweise die Inhaltsstoffe, die in den Medien Dulbecco's modified Eagle Medium (Virology 8 (1959) 396) oder im Medium F12 (Ham's F12 Medium, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 53 (1965) 288) enthalten sind. Dabei handelt es sich u.a. um Aminosäuren, Vitamine sowie andere Komponenten wie Glucose, Natriumpyruvat, bestimmte Fettsäuren und anorganische Salze.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält das Medium Insulin in Mengen von 0,1 bis 20 mg/l und die wasserlösliche Eisenverbindung in einer Konzentration von 10^{-5} bis 10^{-2} mol/l. Als wasserlösliche Eisenverbindung werden insbesondere Eisen(III)-citrat, Eisen(III)-sulfat, Eisen(III)-chlorid und/oder Kaliumhexacyanoferrat(III) eingesetzt.

Für eine Erleichterung bei der Kultivierung ist es im übrigen bevorzugt, dem Medium zusätzlich einen pH-Indikator zuzusetzen. Derartige Verbindungen sind dem Fachmann bekannt. Beispielhaft kann hier Phenolrot genannt werden.

Ein besonders bevorzugtes erfindungsgemäßes serumfreies Medium enthält Aminosäuren in einer Konzentration von 3 bis 700 mg/l, Vitamine von 0,001 bis 50 mg/l, Monosaccharide von 0,3 bis 10 g/l, anorganische Salze von 0,1 bis 10 000 mg/l, Spurenelemente von 0,001 bis 0,1 mg/l, Nukleoside von 0,1 bis 50 mg/l, Fettsäuren von 0,001 bis 10 mg/l, Biotin von 0,01 bis 1 mg/l, Hydrocortison von 0,1 bis 20 μ g/l, Insulin von 0,1 bis 20 mg/l, Vitamin B12 von 0,1 bis 10 mg/l, Putrescin von 0,01 bis 1 mg/l, Natriumpyruvat von 10 bis 500 mg/l die wasserlösliche Eisenverbindung sowie gegebenenfalls einen pH-Indikator und Antibiotika, wobei die vorgenannten Verbindungen gelöst in Wasser vorliegen. Die Konzentrationsangaben beziehen sich dabei jeweils auf die einzelne Komponente und nicht auf die Summe der genannten Verbindungen. So können erfindungsgemäß beispielsweise Mischungen von DMEM- und F12-Medium eingesetzt werden. Auch andere käuflich erhältliche Medien, die den Zusammensetzungen, wie sie oben

angegeben sind, entsprechen, können als Grundmedien verwendet werden und dann mit den speziellen Komponenten rekombinantes Insulin und wasserlöslicher Eisenverbindung entsprechend ergänzt werden.

Im Rahmen der Erfindung ist es weiterhin besonders bevorzugt, daß das Medium zusätzlich Polyvinylalkohol und/oder Methylcellulose enthält. Die Verwendung von Polyvinylalkohol ist beispielsweise in der europäischen Patentanmeldung 0 248 656, ebenso wie von B.D. Bavister in The Journal of Experimental Zoology 217 (1981), 45-51 und Shintani et al. in Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 (1988), 533-537 beschrieben. Auch für das erfindungsgemäße Medium ist der Zusatz von Polyvinylalkohol und/oder Methylcellulose vorteilhaft. Vorzugsweise werden die Verbindungen dabei in einer Konzentration von 0,1 bis 20 g/l eingesetzt.

10 Das erfindungsgemäße Medium ist insbesondere dadurch gekennzeichnet, daß es sich besonders zur Kultivierung von CHO-Zellen eignet. Insbesondere bei der Kultivierung von CHO-Zellen, die ein Fremdgen enthalten und exprimieren, hat sich die besonders gute Eignung des erfindungsgemäßen Mediums gezeigt. Im Rahmen der Erfindung handelt es sich bei dem zu exprimierenden Fremdgen in den CHO-Zellen vorzugsweise um das Gen für Erythropoietin.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Kultivierung von Säugerzellen, insbesondere CHO-Zellen in einem erfindungsgemäßen Medium. Dabei hat sich als bevorzugt eine Verfahrensweise herausgestellt, bei der man ein an bestimmten Substanzen verarmtes erfindungsgemäßes Kultivierungsmedium verwendet und dann während der Kultivierung zweimal, vorzugsweise nach 48 und 96 Stunden, jeweils 2 Vol.-% einer Mischung aus 0,1 bis 1 g/l rekombinantem Insulin, 40 bis 200 g/l Glucose und je 0,4 bis 3 g/l Asparaginsäure, Asparagin x H₂O, Histidin, Methionin, Prolin, Serin, 1 bis 5 g/l Cystein x HCl x H₂O, 1 bis 8 g/l Glutamin und 0,2 bis 2 g/l Tryptophan zusetzt, wonach die entsprechenden Konzentrationen des erfindungsgemäßen Mediums erreicht sind. Bei dieser bevorzugten Verfahrensführung hat sich gezeigt, daß das Wachstum über einen langen Zeitraum bei einer relativ hohen Rate gehalten werden kann und damit Zellmengen erhalten werden können, die höher sind als bei sofortiger Verwendung des Kultivierungsmediums und dem von Anfang an einsetzenden Verbrauch der entsprechenden Verbindungen.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren wird wiederum vorzugsweise zur Kultivierung von CHO-Zellen angewandt, insbesondere von CHO-Zellen, die Erythropoietin sezernieren.

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur gentechnologischen Herstellung von Erythropoietin, bei dem man das Gen für Erythropoietin enthaltende CHO-Zellen in einem erfindungsgemäßen Medium bzw. gemäß einem der erfindungsgemäßen Verfahren kultiviert und das Erythropoietin aus dem Kulturmedium isoliert.

30 Die folgenden Beispiele sollen in Verbindung mit den Figuren die Erfindung weiter erläutern.

Fig. 1 zeigt hierbei die Lebendzelldichte in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer bei Verwendung verschiedener Medien und

35 Fig. 2 zeigt die Gesamtzelldichte in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.

Beispiele

40 Beschreibung des in den Beispielen verwendeten Mediums

Das Medium der unten aufgeführten Beispiele enthält Aminosäuren in einer Konzentration von 3 bis 700 mg/l, Vitamine von 0,001 bis 50 mg/l, Monosaccharide von 0,3 bis 10 g/l, anorganische Salze von 0,1 bis 10000 mg/l, Spurenelemente von 0,001 bis 0,1 mg/l, Nukleoside von 0,1 bis 50 mg/l, Fettsäuren von 0,01 bis 10 mg/l, außerdem Na-Pyruvat (10 - 500 mg/l) und einen pH-Indikator. Das Medium wurde auf Basis einer aus gleichen Volumenanteilen bestehenden Mischung der Medien DMEM und F12 (Dulbeccos Modified Eagles Medium und Nutrient Mixture Hams F-12) hergestellt. An besonderen Komponenten sind enthalten:

Biotin	0,2036 mg/l
Hydrocortison	3,6 µg/l
Insulin (rekombinant)	5,0 mg/l
Putrescin	0,1 mg/l
Vitamin B12	0,78 mg/l

Im Medium von Beispiel 1 ist außerdem enthalten:

Transferrin (human)	5 mg/l
Na-Selenit	5 μ g/l
Polyvinylalkohol	1 g/l

5

Im Medium von Beispiel 2 ist außerdem enthalten:

10

Eisen-Citrat	124 mg/l
Polyvinylalkohol	1 g/l

15

Im Medium von Beispiel 3 ist außerdem enthalten:

20

Eisen-Citrat	124 mg/l
Methyl-Zellulose	0,5 g/l

In allen drei Beispielen wurden CHO-Zellen unter den üblichen Bedingungen (37°C, 5% CO₂) kultiviert.

25 Beispiel 1

Beim Einsatz eines Mediums, das 5 mg/l Transferrin, 5 μ g/l Na-Selenit und 1 g/l Polyvinylalkohol enthält, wurden als maximale Werte für die Lebendzelldichte $8,1 \times 10^5$ /ml (nach 189 Stunden Kulturdauer) und für die Gesamtzelldichte $10,8 \times 10^5$ /ml (nach 197 Stunden Kulturdauer) erreicht.

30

Beispiel 2

Beim Einsatz eines Mediums, das 124 mg/l Eisen-Citrat und 1 g/l Polyvinylalkohol enthält, wurden als maximale Werte für die Lebendzelldichte $15,3 \times 10^5$ /ml (nach 164 Stunden Kulturdauer) und für die Gesamtzelldichte $25,7 \times 10^5$ /ml (nach 164 Stunden Kulturdauer) erreicht.

Beispiel 3

Beim Einsatz eines Mediums, das 124 mg/l Eisen-Citrat und 0,5 g/l Methyl-Zellulose enthält, wurden als maximale Werte für die Lebendzelldichte $14,4 \times 10^5$ /ml (nach 185 Stunden Kulturdauer) und für die Gesamtzelldichte $26,0 \times 10^5$ /ml (nach 193 Stunden Kulturdauer) erreicht.

Die erhaltenen Werte für die Lebend- bzw. Gesamtzelldichte der Beispiele 1 bis 3 sind in den Figuren 1 und 2 graphisch dargestellt.

45 Patentansprüche

1. Serumfreies Medium zur Kultivierung von Säugerzellen ohne Proteinmaterial tierischen Ursprungs, enthaltend neben üblichen Inhaltsstoffen anstelle von tierischem Insulin und Transferrin rekombinantes Insulin aus Prokaryonten und eine wasserlösliche Eisenverbindung.

50

2. Medium nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,

daß es Insulin in Mengen von 0,1 bis 20 mg/l und die wasserlösliche Eisenverbindung in einer Konzentration von 10^{-5} bis 10^{-2} mol/l enthält.

55

3. Medium nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,

daß es als wasserlösliche Eisenverbindung Eisencitrat, Eisensulfat, Eisenchlorid und/oder Kaliumhexa-

cyanoferrat enthält.

4. Medium nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es zusätzlich einen pH-Indikator enthält.
5. Serumfreies Medium nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es aus Aminosäuren in einer Konzentration von 3 bis 700 mg/l, Vitaminen von 0,001 bis 50 mg/l, 10 Monosacchariden von 0,3 bis 10 g/l, anorganischen Salzen von 0,1 bis 10 000 mg/l, Spurenelementen von 0,001 bis 0,1 mg/l, Nukleosiden von 0,1 bis 50 mg/l, Fettsäuren von 0,001 bis 10 mg/l, Biotin von 0,01 bis 1 mg/l, Hydrocortison von 0,1 bis 20 µg/l, Insulin von 0,1 bis 20 mg/l, Vitamin B12 von 0,1 bis 10 mg/l, Putrescin von 0,01 bis 1 mg/l, Natriumpyruvat von 10 bis 500 mg/l, der wasserlöslichen Eisenverbindung, sowie gegebenenfalls einem pH-Indikator und Antibiotika, gelöst in Wasser, besteht.
6. Medium nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es zusätzlich Polyvinylalkohol und/oder Methylcellulose vorzugsweise in einer Konzentration von 0,1 bis 20 g/l enthält.
7. Medium nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich besonders zur Kultivierung von CHO-Zellen, insbesondere von CHO-Zellen, die ein Fremdgren enthalten und exprimieren, eignet.
8. Medium nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem zu exprimierenden Fremdgren um das Gen für Erythropoietin handelt.
9. Verfahren zur Kultivierung von Säugerzellen, insbesondere CHO-Zellen,
dadurch gekennzeichnet,
daß man sie in einem Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 8 kultiviert.
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein verarmtes Kultivierungsmedium verwendet und während der Kultivierung zweimal, bevorzugt nach 48 und 96 Stunden, jeweils 2 Vol.-% einer Mischung aus 0,1 bis 1 g/l rekombinantern Insulin, 35 40 bis 200 g/l Glucose und je 0,4 bis 3 g/l Asparaginsäure, Asparagin x H₂O, Histidin, Methionin, Prolin, Serin, 1 bis 5 g/l Cystein x HCl x H₂O, 1 bis 8 g/l Glutamin und 0,2 bis 2 g/l Tryptophan zusetzt, 40 wonach die entsprechenden Konzentrationen eines Mediums nach einem der Ansprüche 1 bis 8 erreicht sind.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man CHO-Zellen kultiviert, die Erythropoietin sezernieren.
12. Verfahren zur gentechnologischen Herstellung von Erythropoietin,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das Gen für Erythropoietin enthaltende CHO-Zellen in einem Medium nach einem der 50 Ansprüche 1 bis 8 bzw. gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11 kultiviert und das Erythropoietin aus dem Kulturmedium isoliert.

Fig.1

SERUMFREIE KULTIVIERUNG VON CHO-ZELLEN IM 10l-FERMENTER:
LEBENDZELLDICHTE

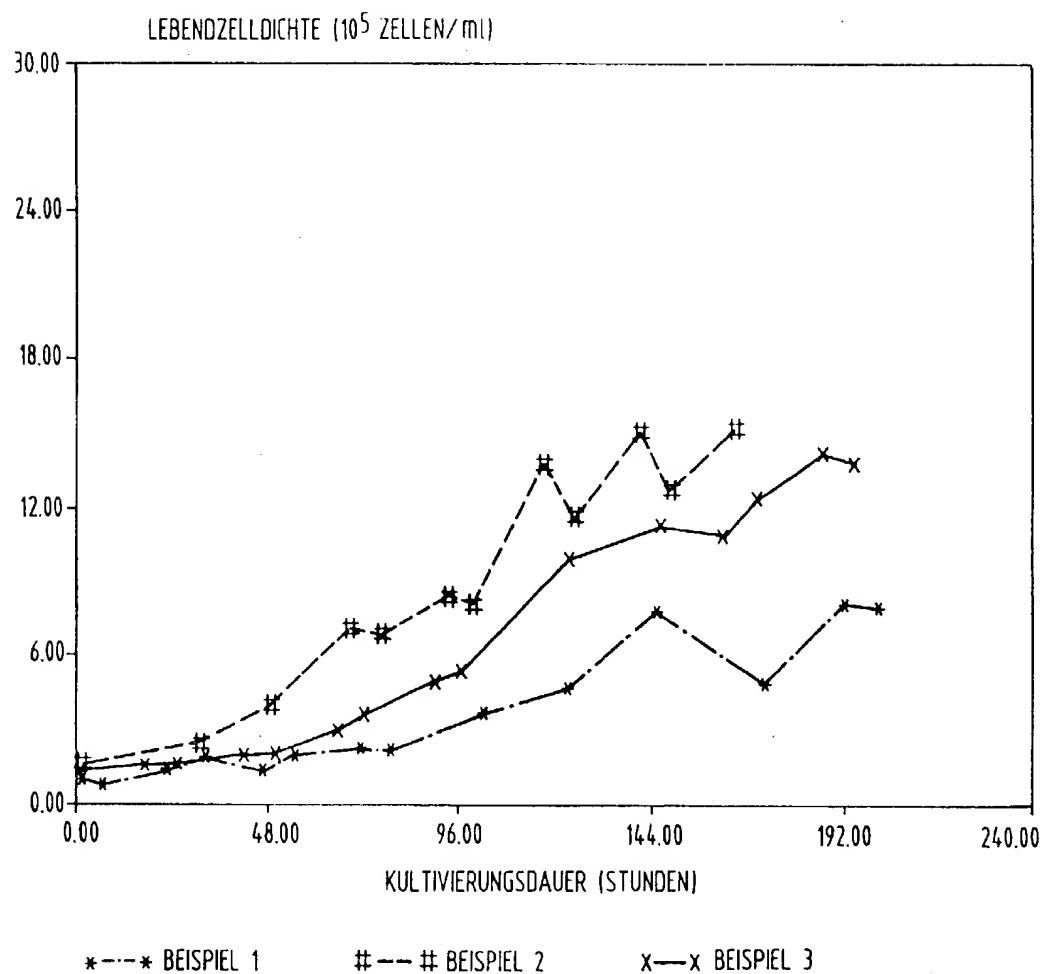
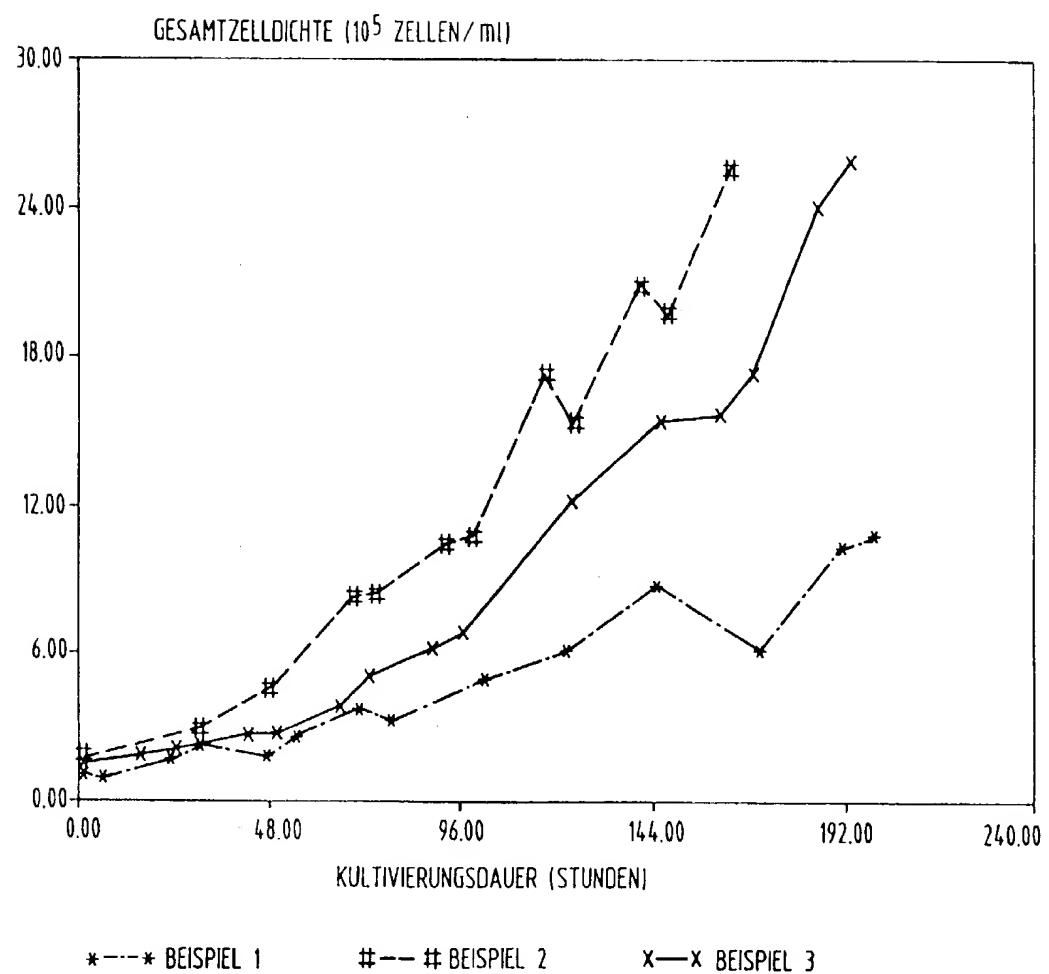


Fig. 2

SERUMFREIE KULTIVIERUNG VON CHO-ZELLEN IM 10l-FERMENTER:
GESAMTZELLDICHTE



PTO 04-2689

European Patent Application No. 0 513 738 A2

A SERUM-FREE MEDIUM FOR CULTIVATION OF MAMMALIAN CELLS

Dr. Stefan Koch et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
WASHINGTON, D.C. APRIL 2004
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

EUROPEAN PATENT OFFICE
EUROPEAN PATENT NO. 0 513 738 A2

Int. Cl. ⁵ :	C 12 N 5/00 C 12 N 5/06
Filing No.:	92107997.6
Filing Date:	May 12, 1992
Publication Date:	November 19, 1992 Patent Bulletin 92/47
Priority	
Date:	May 14, 1991
Country:	DE
No.:	4115722
Designated Contracting States:	AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, PT, SE

A SERUM-FREE MEDIUM FOR CULTIVATION OF MAMMALIAN CELLS

[Serumfreies Medium zur Kultivierung von Säugerzellen]

Inventors: Dr. Stefan Koch et al.

Applicant: Boehringer Mannheim GmbH

The invention concerns a serum-free medium for cultivation of mammalian cells without protein material of animal origin, and a method for cultivation of mammalian cells, especially CHO cells, using such a medium, and finally a method for genetic engineering production of erythropoietin, in which the correspondingly transformed CHO cells grow in the culture medium in accordance with the invention.

In general, serum, most often fetal calf serum, is a prerequisite as an addition to a medium for the growth of animal cells in a culture. A certain amount of serum is mixed into a base medium containing certain basic components, for example inorganic salts, amino acids, monosaccharides, vitamins, etc., so that the most favorable conditions possible for growth in the cell culture are presented to the cells.

Now there have already been attempts to replace the serum with substitutes in known serum-free media. For instance, a serum-free medium for cultivation of hybridoma and myeloma cells that contains, besides other known additives, a water-soluble iron compound in a synthetic culture medium, is known from DE-OS [Offenlegungsschrift] 37-33-453. In the description it is noted in this regard that this water-soluble iron compound is a substitute for the transferrin contained in the serum. According to this patent application, said media can be used for cultivation of hybridoma and myeloma cells.

However, there are other substances in serum that can affect the growth of mammalian cells. Besides transferring, one should mention in particular insulin and albumin here. For the cultivation of mammalian cells using a serum-free medium one should really generally take as much care as possible to come as close as possible to the conditions that are present when serum is added. However, for the production of drugs the substances that are used are critical. Here in the case of cell culture products the approval authorities take a close look at the use of proteins that are of animal or human origin as additions to a culture medium, since pathogenic viruses, for example, can get into the cell culture media and possibly into the end product via these components.

The task of the invention therefore was to create a serum-free culture media for mammalian cells of a really quite general type that comes very close to the cultivation conditions when using a medium containing serum, but that does not contain any protein material of animal origin, which could present a danger of viral contamination.

This task is solved by a serum-free medium for cultivation of mammalian cells without protein material of animal origin that contains, besides the usual ingredients, recombinant insulin from prokaryotes and a water-soluble iron compound, instead of animal insulin and transferrin.

By retaining the insulin in the medium in accordance with the invention the cultivation conditions are clearly closer to the cultivation conditions when serum is used than is the case with the known serum-free culture media. Moreover, by using recombinant insulin from prokaryotes in the medium in accordance with the invention the danger of viral contaminations is avoided.

The usual ingredients of culture media are known to the specialist and are, for example, the ingredients that are contained in Dulbecco's modified Eagle medium (Virology 8 (1959) 396) or in F12 medium (Ham's F12 medium, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53 (1965) 288). These substances are, among others, amino acids, vitamins, as well as other components like glucose, sodium pyruvate, certain fatty acids, and inorganic salts.

In a preferred embodiment of the invention the medium contains insulin in amounts from 0.1-20 mg/L and the water-soluble compound in a concentration from 10^{-5} - 10^{-2} mol/L. In

particular, iron(III) citrate, iron(III) sulfate, iron(III) chloride, and/or potassium hexacyanoferrate(III) are used as water-soluble iron compound.

Incidentally, the addition of a pH indicator to the medium to make things easier during cultivation is preferred. Such compounds are known to the specialist. Phenol red may be mentioned here as an example.

A serum-free medium that is especially preferred in accordance with the invention contains amino acids in a concentration from 3-700 mg/L, vitamins from 0.01-50 mg/L, monosaccharides from 0.3-10 g/L, inorganic acids from 0.1-10,000 mg/L, trace elements from 0.001-0.1 mg/L, nucleotides from 0.1-50 mg/L, fatty acids from 0.001-10 mg/L, biotin from 0.01-1 mg/L, hydrocortisone from 0.1-20 µg/L, insulin from 0.1-20 mg/L, vitamin B12 from 0.1-10 mg/L, putrescin from 0.01-1 mg/L, sodium pyruvate from 10-500 mg/L, the water-soluble iron compound, and optionally a pH indicator and antibiotics, where the said compounds are present dissolved in water. The concentration data here refer in each case to the individual component and not to the sum of said compounds. For example, mixtures of DMEM and F12 medium can be used in accordance with the invention. Also, other commercially available media that correspond to the compositions as indicated above can be used as base media and then be appropriately supplemented with the special components-recombinant insulin and water-soluble iron compound. It is additionally especially preferred within the scope of the invention for the medium also to contain polyvinyl alcohol and/or methylcellulose. The use of polyvinyl alcohol is described, for example, in European Patent Application 0 248 656 and also by B. D. Bavister in The Journal of Experimental Zoology 217 (1981), 45-51 and by Shintani et al. in Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 (1988), 533-537. The addition of polyvinyl alcohol and/or methylcellulose is also advantageous for the medium in accordance with the invention. Preferably, the compounds are used in this case in a concentration from 0.1-20 g/L.

The medium in accordance with the invention is in particular characterized by the fact that it is especially suitable for cultivation of CHO cells. The particularly good suitability of the medium in accordance with the invention appeared especially in the cultivation of CHO cells that contain and express a foreign gene. Within the scope of the invention the foreign gene to be expressed in the CHO cells is preferably the gene for erythropoietin.

Therefore, another object of the invention is a method for cultivation of mammalian cells, especially CHO cells, in a medium in accordance with the invention. Preferred is a procedure in which a culture medium in accordance with the invention that is low in certain substances is used and then twice during the cultivation, preferably after 48 and 96 h, 2 vol% of a mixture of 0.1-1 g/L recombinant insulin, 40-200 g/L glucose and 0.4-3 g/L each aspartic acid, asparagine·H₂O, histidine, methionine, proline, serine, 1-5 g/L cysteine HCl·H₂O, 1-8 g/L glutamine and 0.2-2 g/L tryptophan are added, after which the corresponding concentrations in

the medium in accordance with the invention are achieved. It turned out with this preferred procedure that the growth can be maintained at a relatively high rate over a long period of time and higher cell quantities can be produced than when the culture medium is used directly and the corresponding compounds are consumed right from the start.

Again the method in accordance with the invention is employed for cultivation of CHO cells, especially CHO cells that produce erythropoietin.

Another object of the invention therefore is a method for genetic engineering production of erythropoietin, in which the CHO cells containing the gene for erythropoietin are cultivated in a medium in accordance with the invention or by a method in accordance with the invention and the erythropoietin is isolated from the culture medium.

The following examples in combination with the figures are intended to illustrate the invention further.

Figure 1 here shows the live cell density in dependence on cultivation time when using different media and

Figure 2 shows the total cell density in dependence on the cultivation time.

Examples

Description of the medium used in the examples

The medium in the examples given below contains amino acids in a concentration of 3-700 mg/L, vitamins from 0.001-50 mg/L, monosaccharides from 0.3-10 g/L, inorganic salts from 0.1-10,000 mg/L, trace elements from 0.001-0.1 mg/L, nucleosides from 0.1-50 mg/L, fatty acids from 0.01-10 mg/L, also Na pyruvate (10-500 mg/L), and a pH indicator. The mixture was prepared on the basis of a mixture consisting of equal volumes of DMEM and F12 media (Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Ham's F-12 Nutrient Mixture). The following particular components are contained in it:

Biotin	0.2036 mg/L
Hydrocortisone	3.6 µg/L
Insulin (recombinant)	5.0 mg/L
Putrescine	0.1 mg/L
Vitamin B12	0.78 mg/L

In addition, the medium of Example 1 contains:

Transferrin (human)	5 mg/L
Na selenite	5 µg/L
Polyvinyl alcohol	1 g/L

In addition, the medium of Example 2 contains:

Iron citrate	124 mg/L
Polyvinyl alcohol	1 g/L

In addition, the medium of Example 3 contains:

Iron citrate	124 mg/L
Methylcellulose	0.5 g/L

In all three examples CHO cells were cultivated under the usual conditions (37°C, 5% CO₂).

Example 1

When using a medium containing 5 mg/L transferrin, 5 µg/L Na selenite and 1 g/L polyvinyl alcohol, maximum values achieved were 8.1×10^5 /mL for the live cell density (after 189 h culture time) and 10.8×10^5 /mL for the total cell density (after 197 h culture time).

Example 2

When using a medium containing 124 mg/L iron citrate and 1 g/L polyvinyl alcohol, maximum values achieved were 15.3×10^5 /mg [sic] for the live cell density (after 164 h culture time) and 25.7×10^5 /mL for the total cell density (after 164 h culture time).

Example 3

When using a medium containing 124 mg/L iron citrate and 0.5 g/L methylcellulose, maximum values achieved were 14.4×10^5 /mL for the live cell density (after 185 h culture time) and 26.0×10^5 /mL for the total cell density (after 193 h culture time).

The values obtained for the live and total cell densities in Examples 1-3 are graphically represented in Figures 1 and 2.

Claims

1. A serum-free medium for cultivation of mammalian cells without protein material of animal origin containing besides the usual ingredients, recombinant insulin from prokaryotes and a water-soluble iron compound instead of animal insulin and transferrin.

2. A medium as in Claim 1, which is characterized by the fact that it contains insulin in amounts from 0.1-20 mg/L and the water-soluble iron compound in a concentration from 10^{-5} - 10^{-2} mol/L.

3. A medium as in Claim 1 or 2, which is characterized by the fact that iron citrate, iron sulfate, iron chloride, and/or potassium hexacyanoferrate is contained as a water-soluble iron compound.

4. A medium as in one of the preceding claims, which is characterized by the fact that it additionally contains a pH indicator.

5. A serum-free medium as in one of the preceding claims, which is characterized by the fact that it consists of amino acids in a concentration from 3-700 mg/L, vitamins from 0.001-50 mg/L, monosaccharides from 0.3-10 g/L, inorganic salts from 0.1-10,000 mg/L, trace elements from 0.001-0.1 mg/L, nucleosides from 0.1-50 mg/L, fatty acids from 0.01-10 mg/L, biotin from 0.01-1 mg/L, hydrocortisone from 0.1-20 μ g/L, insulin from 0.1-20 mg/L, vitamin B12 from 0.1-10 mg/L, putrescin from 0.01-1 mg/L, sodium pyruvate from 10-500 mg/L, the water-soluble iron compound, and optionally a pH indicator and antibiotics, dissolved in water.

6. A medium as in one of the preceding claims, which is characterized by the fact that it additionally contains polyvinyl alcohol and/or methylcellulose, preferably in a concentration from 0.1-20 g/L.

7. A medium as in one of the preceding claims, which is characterized by the fact that it is especially suitable for cultivation of CHO cells, especially CHO cells that contain and express a foreign gene.

8. A medium as in Claim 7, which is characterized by the fact that the foreign gene to be expressed is the gene for erythropoietin.

9. A method for cultivation of mammalian cells, especially CHO cells, which is characterized by the fact that they are cultivated in a medium as in one of Claims 1-8.

10. A method as in Claim 9, which is characterized by the fact that one uses a depleted culture medium and twice during the cultivation, preferably after 48 and 96 h, 2 vol% of a mixture of 0.1-1 g/L recombinant insulin, 40-200 g/L glucose and 0.4-3 g/L each aspartic acid, asparagine·H₂O, histidine, methionine, proline, serine, 1-5 g/L cysteine·HCl·H₂O, 1-8 g/L glutamine and 0.2-2 g/L tryptophan are added each time, after which the corresponding concentrations of the medium as in one of Claims 1-8 are achieved.

11. A method as in Claim 9 or 10, which is characterized by the fact that CHO cells that produce erythropoietin are cultivated.

12. A method for genetic engineering production of erythropoietin, which is characterized by the fact that CHO cells containing the gene for erythropoietin are cultivated in a

medium as in one of Claims 1-8 or by a method as in one of Claims 9-11 and the erythropoietin is isolated from the culture medium.

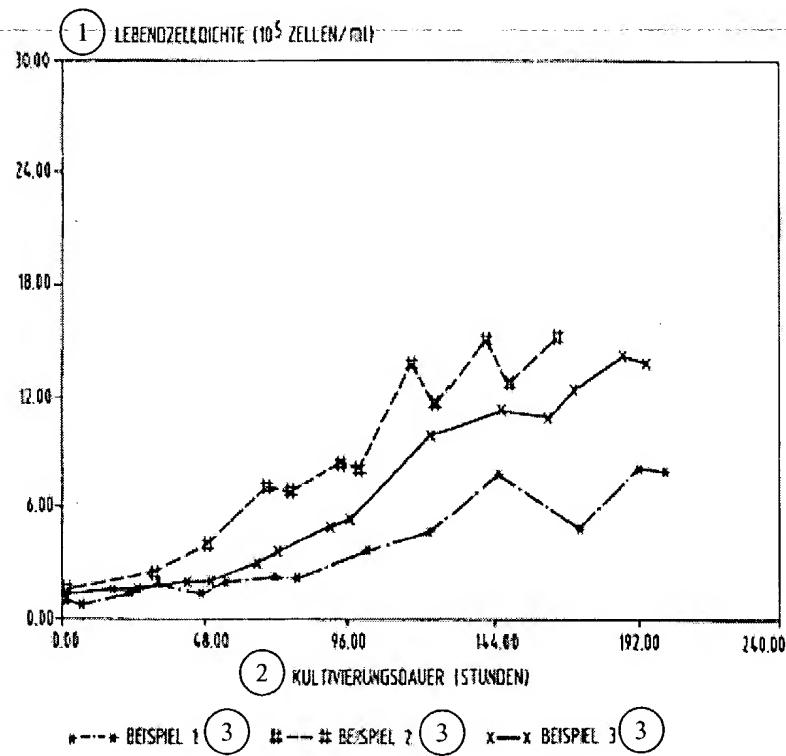


Figure 1. Serum-free cultivation of CHO cells in a 10-L fermenter: live cell density

Key: 1 Live cell density (10^5 cells/mL)
 2 Culture time (h)
 3 Example _____

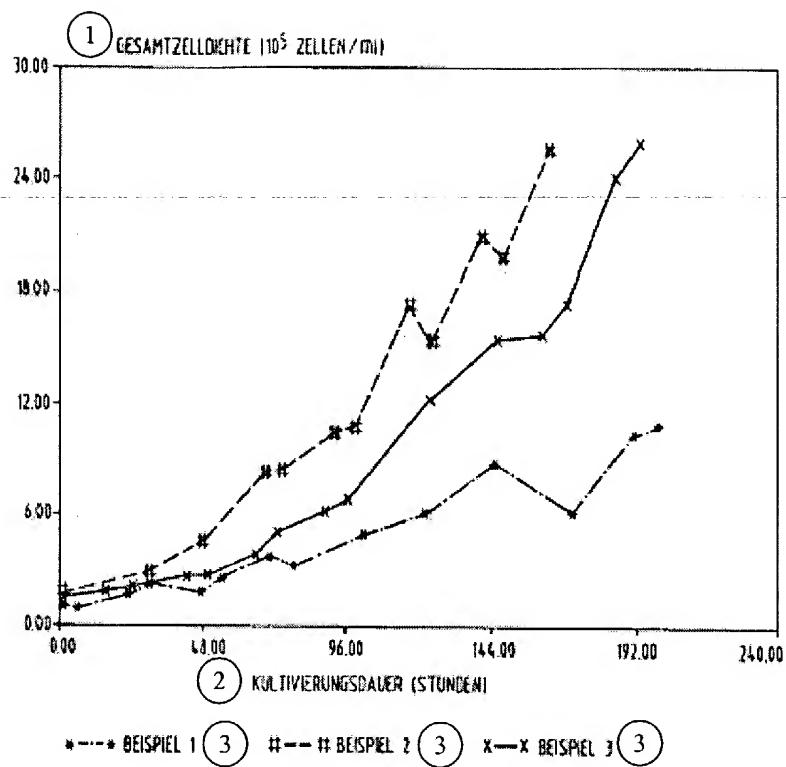


Figure 2. Serum-free cultivation of CHO cells in a 10-L fermenter: total cell density

Key:

- 1 Total cell density (10⁵ cells/mL)
- 2 Culture time (h)
- 3 Example